

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного
учреждения «Федеральный научно-
исследовательский центр «Кристаллография и
фотоника» Российской академии наук»
кандидат физико-математических наук
Алексеева Ольга Анатольевна

«25» февраля 2022 г.

М.П.



ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу Смитиенко Ольги Александровны «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность темы исследований. Родопсины представляют собой обширную группу фоточувствительных ретинальсодержащих белков, встречающихся как в различных микробных организмах (родопсины 1 типа), так и в организмах животных (родопсины 2 типа). Родопсины 1 типа очень разнообразны по принципу работы (фотоактивируемые ионные насосы и каналы, сенсорные и энзиматические белки) и по выполняемым функциям (в основном фотоэнергетическая, а также фотоинформационная и фотоэнзиматическая). Родопсины 2 типа относятся к семейству G-белок-связывающих рецепторов, выполняющих в основном фотоинформационную (зрительную) функцию. В основе функционирования родопсинов лежит фотохимическая реакция изомеризации хромофорной группы ретиналя, которая протекает когерентно, с крайне высокой скоростью (в фемтосекундном временном диапазоне), квантовым выходом и селективностью (по 13-транс и 11-цис связям в родопсинах 1 и 2 типа, соответственно). Эти характеристики реакции определяются как физико-химическими свойствами хромофора, так и хромофор-белковыми взаимодействиями. Изучение фотореакции родопсинов в реальном времени стало возможным с появлением лазеров сверхкоротких импульсов в начале 1990-х годов и до настоящего времени остается

актуальным направлением фотохимии и фотобиологии. Одной из особенностей этой реакции является ее фотообратимость на разных стадиях фотоактивируемых изменений белка, что реализуется при функционировании некоторых родопсинов.

Диссертационная работа Смитиенко О.А. посвящена изучению сверхбыстрых фотохромных реакций двух наиболее типичных представителей родопсинов 1 и 2 типа, протонного насоса бактериородопсина археи *Halobacterium salinarum* и зрительного родопсина быка *Bos taurus*, соответственно. Фотохромные реакции изучались методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии с временным разрешением 20–30 фс при комнатной температуре. Исследуемые фотореакции включают в себя прямые фотореакции (первичные реакции), осуществляемые в природе в процессе функционирования данных белков, а также обратные фотореакции, индуцируемые лазерными импульсами в фемто- и пикосекундном временном диапазоне. Несмотря на то, что способность родопсинов к фотохромным переходам была известна, исследования, проведенные в настоящей работе на столь коротких временах ($1 \cdot 10^{-13}$ – 10^{-12} с), позволяют глубже понять механизм первичных фото процессов, протекающих в ретинальсодержащих белках. Поскольку родопсины 1 и 2 типа характеризуются общностью строения и механизма функционирования, но не имеют гомологии аминокислотной последовательности, было проведено сравнение динамики и механизма фотохромных реакций различных представителей этих двух групп белков.

Цель диссертационной работы заключалась в исследовании механизма фотохромной реакции изомеризации хромофора в зрительном родопсине и бактериородопсине.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи: 1) исследовать динамику прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен; 2) исследовать обратную фотореакцию зрительного родопсина и бактериородопсина, инициированную из первых двух продуктов прямой фотореакции; 3) провести сравнение фотохромных реакций бактериородопсина и зрительного родопсина как представителей родопсинов 1 и 2 типа, соответственно.

Основное содержание работы. Диссертационная работа Смитиенко О.А. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания полученных результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, списка терминов и списка цитируемой литературы, включающего 268 источников. Текст диссертации изложен на 142 страницах, содержит 46 иллюстраций и 5 таблиц.

Название работы отражает суть диссертации. Содержание и структура соответствуют требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертационным работам.

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи, обоснован выбор объектов и методов исследования, раскрыта научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы. Также во введении отмечен личный вклад автора в работу и степень достоверности результатов, приведена информация об опубликованных статьях и апробации работы на российских и международных конференциях.

В **Главе 1** (литературный обзор) приведены сведения о родопсинах 1 и 2 типа: данные о классификации, общности и различии в строении, а также о фотоактивируемых процессах. Обсуждается возможное применение родопсинов в оптогенетике и их фотохромные свойства. Подробно описаны объекты исследования – зрительный родопсин и бактериородопсин, их строение, спектральные характеристики, процесс фотолиза зрительного родопсина и фотоцикл бактериородопсина, а также связь этих процессов с функционированием исследуемых белков. Большое внимание уделено имеющимся экспериментальным и теоретическим исследованиям первичных реакций зрительного родопсина и бактериородопсина, механизм которых описан с помощью моделей двух и трех состояний, соответственно. В обзоре достаточно полно отражена степень разработанности темы исследования и современное состояние проблемы.

Глава 2 (материалы и методы) содержит описание методов исследования. В ней представлен список реагентов и методика приготовления образцов, подробно описаны метод фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии и экспериментальная лазерная установка, разработанная в ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН, а также методика обработки экспериментальных данных.

В **Главе 3** (результаты) приведены результаты исследования прямой и обратной фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина, протекающих в фемто- и пикосекундном диапазоне времен. Получены кинетические характеристики образования первичных продуктов и интермедиатов прямой фотореакции исследуемых белков. Показано, что прямая фотореакция в зрительном родопсине протекает за время, равное ~60 фс, а в бактериородопсине – 480 фс. Показана возможность обратных фотопереходов из первичных продуктов прямой фотореакции зрительного родопсина (фотородопсина и батородопсина) и бактериородопсина (интермедиатов J_{625} и K_{590}), на эффективность которых влияют когерентные эффекты прямых фотореакций, значительно более выраженные в зрительном родопсине. Рассчитан квантовый выход фотопереходов фотородопсин → родопсин, батородопсин → родопсин и K_{590} → бактериородопсин, который составил 0,14, 0,15 и 0,81, соответственно. Показано, что скорость обратной фотореакции зрительного родопсина, инициированной из первого продукта прямой фотореакции фотородопсина, сравнима со скоростью прямой фотореакции.

В **Главе 4** (обсуждение результатов) приведен анализ полученных результатов и сопоставление их с известными представлениями и гипотезами. Для прямых и обратных фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина предложены кинетические схемы. Высказано предположение о гетерогенности исходного состояния исследуемых белков. Механизм прямых фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина обсуждается на основе моделей двух и трех состояний, соответственно. Механизм обратных фотореакций обсуждается на основе концепции одного конического пересечения S_1/S_0 поверхностей потенциальной энергии, участвующего как в прямой, так и в обратных фотореакциях. Сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных в работе по бактериородопсину и зрительному родопсину как типичным представителям родопсинов 1 и 2 типа, показал, что в случае прямой фотореакции: (1) для описания реакции можно применить одну и ту же кинетическую схему; (2) когерентный характер реакции наиболее выражен в зрительном родопсине как следствие безбарьерного движения вдоль S_1 поверхности потенциальной энергии, что также приводит к крайне высокой скорости изомеризации ретиналя по сравнению с бактериородопсином; (3) различия в динамике реакции зрительного родопсина и бактериородопсина могут быть связаны с различиями исходных изомерных форм их хромофоров, а также с влиянием белкового окружения на хромофор. При сравнении обратных фотореакций исследуемых белков было показано, что: (1) поглощение кванта света первыми двумя продуктами прямой фотореакции приводит к обратному переходу в исходное состояние без образования побочных продуктов; (2) на эффективность обратного фотоперехода влияет когерентный характер прямой фотореакции, что ярко выражено в случае зрительного родопсина; (3) квантовые выходы обратной фотореакции, инициированной в раннем пикосекундном временном диапазоне, в зрительном родопсине и бактериородопсине значительно различаются (0,15 и 0,81, соответственно), что может быть связано с большей надежностью фотобиологического механизма преобразования света в информационный процесс в эволюционно более «молодых» родопсинах 2 типа по сравнению с механизмом преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более «древних» родопсинах 1 типа.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые проведено сравнительное спектральное исследование быстрых фотохромных реакций двух ретинальсодержащих белков, бактериородопсина и зрительного родопсина как представителей родопсинов 1 и 2 типа, соответственно. Исследование проведено на современной экспериментальной фемтосекундной лазерной установке при комнатной температуре с высоким временным разрешением (20–30 фс) и накоплением сигнала для статистической обработки данных, которое обеспечивает высокое соотношение сигнал/шум. Это позволило подробно изучить

прямую и обратную фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен.

– Были предложены кинетические схемы фотохромных реакций и определено время протекания прямой фотореакции исследуемых белков.

– Впервые было экспериментально показано, что скорость обратной фотореакции зрительного родопсина, инициированной с задержкой 200 фс, сравнима со скоростью прямой фотореакции.

– Впервые показана возможность инициирования обратной фотореакции бактериородопсина в раннем пикосекундном временном диапазоне из первичных продуктов прямой фотореакции.

– Сравнительный анализ фотохромной реакции бактериородопсина и зрительного родопсина показал, что, в отличие от бактериородопсина, в зрительном родопсине квантовый выход обратной реакции значительно ниже, чем прямой реакции, что, вероятно, повышает надёжность работы зрительного родопсина как фоторецептора.

Полученные результаты и их интерпретация не противоречат современным научным представлениям о закономерностях физико-химических процессов в светочувствительных белках.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение динамики и механизма фотохромной реакции изомеризации ретиналя в родопсинах представляет теоретический интерес, поскольку реакция протекает в когерентном режиме и является одной из самых быстрых фотохимических реакций в природе ($\sim 1 \cdot 10^{-13}$ с), в процессе которой осуществляется эффективное преобразование энергии кванта света в химическую энергию конформационных перестроек белка для выполнения определенных функций.

Установление механизма фотоактивируемых процессов родопсинов открывает возможность использования представителей этой группы белков, как в биологии, так и в медицине, физике и технике. Так, протонный насос бактериородопсин уже много лет активно используется для создания различных научно-технических приложений, а открытие канального родопсина в одноклеточных и колониальных зеленых водорослях в 2001 году дало начало новому направлению, возникшему на стыке биологии и медицины, – оптогенетике. Родопсины 2 типа являются ключевыми белками процесса зрения и участвуют в различных фоторегуляционных процессах высших животных. Эта группа белков также может служить модельной системой для изучения всех G-белок-связывающих рецепторов. Данные по фотохромизму зрительного родопсина и бактериородопсина могут быть использованы при

создании фотохромных материалов с высоким быстродействием в различных технических приложениях и устройствах.

По содержанию работы имеется следующее замечание:

Не вполне ясно, насколько корректно сравнение первичных фотопроцессов зрительного родопсина в составе детергентных мицелл и бактериородопсина в природном окружении в составе пурпурных мембран. Однако, оно не является принципиальным и не снижает ценности диссертационной работы как научного труда высокого уровня.

Диссертационная работа Смитиенко О.А. выполнена в рамках актуальной темы с использованием современного оборудования. Полученные в работе результаты являются новыми и достоверными. Материалы, представленные в диссертации, прошли апробацию на российских и международных научных конференциях и достаточно полно отражены в опубликованных научных работах, соответствующих теме диссертационного исследования, в том числе: в пяти публикациях в профильных высокорейтинговых рецензируемых российских и зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и в одной публикации в книге, индексируемой в базе Scopus. Автореферат диссертационной работы правильно отражает ее содержание. Результаты диссертационной работы Смитиенко О.А. следует рекомендовать для использования в организациях, занимающихся исследованиями в области биофизики, фотобиологии, фотохимии и спектроскопии органических молекул (НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ФГБУН Институте фундаментальных проблем биологии РАН, ФГБУН Институте биофизики клетки РАН и др.).

По содержанию, выводам, объектам и методам исследования диссертационная работа Смитиенко Ольги Александровны соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика, биологические науки, в пунктах 1, 2 и 4.

Диссертационная работа Смитиенко О.А. «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» представляет собой законченную научно-квалификационную работу и удовлетворяет требованиям, установленным пунктами 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства России от 24 сентября 2013 года № 842 в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21 апреля 2016 года № 335, от 01 октября 2018 года № 1168 и от 20 марта 2021 года № 426, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Отзыв был заслушан, обсужден и одобрен на Ученом Совете Центра фотохимии РАН – структурного подразделения Федерального государственного учреждения "Федеральный

научно-исследовательский центр "Кристаллография и фотоника" Российской академии наук"
« 16 » февраля 2022 г. (Протокол № 3).

Отзыв составил:

заместитель руководителя Центра
фотохимии РАН ФНИЦ «Кристаллография
и фотоника» РАН, доцент, кандидат
физико-математических наук

Петров Николай Христофорович

Почтовый адрес: 119333, г. Москва, Ленинский проспект, д. 59

Тел. +7(905) 762 2225

E-mail: welsh_05@mail.ru

Подпись удостоверяю

Ученый секретарь
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН
к.ф.-м.н.

_____ Падинова

